

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-280472

⑤ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	④ 公開 昭和61年(1986)12月11日
C 07 D 211/46		7138-4C	
211/76		7138-4C	
C 07 H 5/04		7330-4C	
// A 61 K 31/445	A E D	7252-4C	
31/71	A D U	7252-4C	審査請求 未請求 発明の数 2 (全14頁)

⑤ 発明の名称 β -ガラクトシダーゼ阻害物質ガラクトスタチン類およびその製造方法

② 特 願 昭60-123135

③ 出 願 昭60(1985)6月5日

⑦ 発 明 者 江 幡 光 雄 富田林市寺池台2-16-12

⑦ 発 明 者 三 宅 幸 雄 羽曳野市桃山台1-6-11

⑦ 出 願 人 塩野義製薬株式会社 大阪市東区道修町3丁目12番地

⑦ 代 理 人 弁理士 潮田 雄一

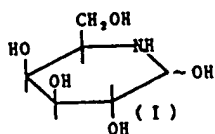
明 細 書

1. 発明の名称

β -ガラクトシダーゼ阻害物質ガラクトスタチン類およびその製造方法

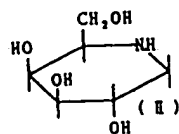
2. 特許請求の範囲

1. 次式で表わされるガラクトスタチン(I):



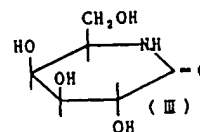
およびその誘導体ならびにそれらの塩。

2. 該誘導体が次式で表わされる1-デオキシガラクトスタチン(II):



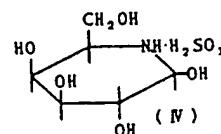
である特許請求の範囲第1項に記載の誘導体。

3. 該誘導体が次式で表わされるガラクトスタチンラクタム(III):



である特許請求の範囲第1項に記載の誘導体。

4. 該塩が次式で表わされるガラクトスタチン亜硫酸付加物(IV):



である特許請求の範囲第1項に記載の塩。

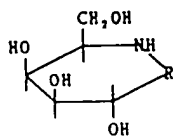
5. ストレプトマイセス属に属するガラクトスタチン産生菌を培地に培養し、培養物からガラクトスタチンを分離採取するガラクトスタチンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

イ. 発明の目的

産業上の利用分野

本発明は新規β-ガラクトシダーゼ阻害物質ガラクトスタチンに関し、さらに詳しくは下記一般式



(式中、Rは 、、 または を表わす。)

で示される新規β-ガラクトシダーゼ阻害物質ガラクトスタチン類、さらにそれらの塩およびその製造法に関するものである。

従来の技術

RNAウィルスで癌化した3T3繊維芽細胞ではグルコシダーゼ活性、特にβ-ガラクトシダー

ゼ活性が上昇することがボスマン (H. B. Bosmann) により報告されている [Biochem. Biophys. Acta. 264, 339(1972)]。そこで、β-ガラクトシダーゼ阻害物質が抗癌剤として利用できる可能性に注目して種々研究されており、たとえば特開昭57-74090; 特公昭53-31238; The Journal of Antibiotics 28, 1006(1975); 同32 (3), 212(1979); および同32 (3), 217(1979)などに記載がある。本発明のガラクトスタチン構造上類似物質としてはたとえば、特公昭43-760; 特開昭51-151393; 特開昭51-151394などに記載があるが構造、生理活性とも異なる。

発明が解決しようとする問題点

β-ガラクトシダーゼ阻害物質としては、先に本発明者らが発見した特開昭57-74090記載のGI-2558-A及びGI-2558-Bが知られているが、これらの物質は非常に不安定で取扱いが非常に困難であった。今回、以前発見されたβ-ガラクトシダーゼ阻害物質と異なる安定な新規酵素阻害物質を見出すことに成功した。

ロ. 発明の構成

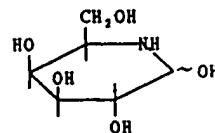
問題点を解決するための手段

GI-2558-A及びGI-2558-Bを生産する菌、ストレプトマイセス・ライディツカスPA-5726、微生物研寄第5657号を詳細に検討した結果、GI-2558-A、GI-2558-B以外にβ-ガラクトシダーゼ阻害活性を有する弱塩基性糖類似物質5-アミノ-5-デオキシ-D-ガラクトピラノースの存在することを見出し、ガラクトスタチンと命名した。その後当菌株の培養条件の検討をおこない、生産性を向上させる事に成功し、ガラクトスタチンを大量に単離・精製した。更にガラクトスタチンよりそのラクタム体及びデオキシ体を調製した。これらの化合物は、いずれもβ-ガラクトシダーゼに対して強い阻害作用を有する酵素阻害物質である。以下にガラクトスタチン、ガラクトスタチン亜硫酸付加物、ガラクトスタチンラクタム、1-デオキシガラクトスタチンの性状を記載する。なお、本発明はこれら化合物のみならず、可能な場合にはこれら化合物の製薬上許容される塩をも包含す

る。

a. ガラクトスタチン

1. 構造式



2. 分子式・分子量

C₆H₁₁NO₆ MW. 179.2

3. 元素分析値

C₆H₁₁NO₆ · ½ H₂O

計算値(%)

C, 38.30; H, 7.50; N, 7.44

実験値(%)

C, 38.26; H, 7.47; N, 7.51

4. 融点及び分解温度

融点: 94~98°C

分解温度: 113~116°C

5. 質量分析スペクトル(第1図参照)

最高質量 $m/z = 161$ ($M - 18$)

6. 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} + 85.6^\circ$ ($c = 1.1$, 水)

7. 紫外線吸収スペクトル

特異的吸収なし

8. 赤外線吸収スペクトル (第2図参照)

ν_{max} 3360, 2900, 1650, 1450, 1400,

1340, 1220, 1085, 970, 876, 806 cm^{-1}

9. 1H 核磁気共鳴スペクトル

第3図のごとく δ 4.6 ~ 2.7 ppm にプロトンのシグナルを示す。

10. 溶解性

水に易溶、メタノール、ジメチルスルホキシド、ピリジン、酢酸に可溶。エタノール、プロパノール、アセトニトリルに微溶。アセトン、エーテル、クロロホルムに不溶

11. 呈色反応

ニンヒドリン反応 陽性

アンモニア性硝酸銀反応 陽性

12. シリカゲル薄層クロマトグラフィー

C. 27.59; H. 5.79; N. 5.36; S. 12.27

実験値 (%)

C. 27.59; H. 5.57; N. 5.38; S. 12.10

4. 融点及び分解温度

融点: 133 ~ 135 $^\circ$

分解温度: 143 ~ 145 $^\circ$

5. 質量分析スペクトル (第4図参照)

最高質量 $m/z = 161$

($M - 100$: $-H_2O$, $-H_2SO_4$)

6. 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} + 17.2^\circ$ ($c = 0.51$, 水)

7. 紫外線吸収スペクトル

特異的吸収なし

8. 赤外線吸収スペクトル (第5図参照)

ν_{max} 3440, 3390, 3240, 2980, 2920,

2800, 2670, 2500, 1596, 1490, 1450, 1400,

1370, 1330, 1290, 1275, 1252, 1226, 1203,

1180, 1140, 1100, 1047, 1020, 955, 930,

805, 720, 622, 580, 525, 507, 445, 412,

357, 326, 310 cm^{-1}

アセトニトリル: 酢酸: 水 (5: 1: 2)

Rf = 0.39

n-ブタノール: 酢酸: 水 (3: 1: 1)

Rf = 0.29

13. β -ガラクトシダーゼ阻害比活性

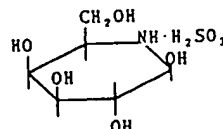
71,200 IU/mg (IC_{50} 0.0035 μ g/ml)

14. 外観

やや吸湿性の白色粉末

b. ガラクトスタナン亜硫酸付加物

1. 構造式



2. 分子式・分子量

$C_6H_{11}NO_5 \cdot H_2SO_4$, MW. 261.3

3. 元素分析値

$C_6H_{11}NO_5S$

計算値 (%)

9. 1H 核磁気共鳴スペクトル

第6図のごとく δ 3.52, 3.50, 3.41, 3.20,

3.03, 2.83 ppm にそれぞれ 1, 1, 1, 2, 1, 1 のプロトンを示す。

10. ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル

第7図のごとく δ 74.0, 72.3, 68.4, 67.6,

60.4, 59.9 ppm に ^{13}C のシグナルを示す。

11. 溶解性

水、メタノール、ジメチルスルホキシドに可溶。エタノールに微溶。アセトン、エーテル、クロロホルムに不溶

12. 呈色反応

ニンヒドリン反応 陽性

アンモニア性硝酸銀反応 陽性

13. シリカゲル薄層クロマトグラフィー

アセトニトリル: 酢酸: 水 (5: 1: 2)

Rf = 0.55

クロロホルム: メタノール: アンモニア

(1: 2: 1) Rf = 0.54

14. β -ガラクトシダーゼ阻害比活性

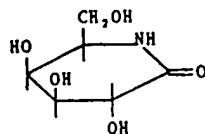
51.900 IU/mg (IC₅₀ 0.0048 mcg/ml)

14. 外観

無色針状結晶

c. ガラクトスタテンラクトム

1. 構造式



2. 分子式・分子量

C₁₁H₁₇NO₄ MW. 177.2

3. 元素分析値

C₁₁H₁₇NO₄

計算値(%)

C. 40.68; H. 6.26; N. 7.91

実験値(%)

C. 40.40; H. 6.07; N. 7.88

4. 融点

204 ~ 206 °C

11. 溶解性

水、メタノールに可溶、エタノール、プロパノールに微溶、アセトン、エーテル、クロロホルムに不溶

12. 呈色反応

ニンヒドリン反応 陽性

アンモニア性硝酸銀反応 凝陽性

13. シリカゲル薄層クロマトグラフィー

アセトニトリル:酢酸:水(5:1:2)

R_f = 0.61

n-ブタノール:酢酸:水(3:1:1)

R_f = 0.34

14. β-ガラクトシダーゼ阻害比活性

43.5 IU/mg (IC₅₀ 5.75 mcg/ml)

15. 外観

無色針状結晶

d. 1-デオキシガラクトスタテン

(以下余白)

5. 質量分析スペクトル(第8図参照)

最高質量 m/z = 178 (M+1)

6. 比旋光度

[α]_D²⁰ +12.2° (c=1.0, 水)

7. 紫外線吸収スペクトル

特異的吸収なし

8. 赤外線吸収スペクトル(第9図参照)

ν_{max} 3380, 3320, 3220, 2970, 2950, 2910, 1660, 1632, 1500, 1470, 1420, 1385, 1368, 1340, 1300, 1255, 1160, 1146, 1120, 1100, 1080, 1060, 1018, 985, 935, 905, 880, 830, 790, 675, 640, 600, 550, 500, 440, 370 cm⁻¹

9. ¹H核磁気共鳴スペクトル

第10図のごとく δ 3.51, 3.49, 3.22,

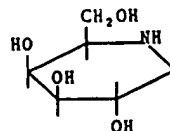
3.15~2.85ppmに1, 1, 1, 3のプロトンを示す。

10. ¹³C核磁気共鳴スペクトル

第11図のごとく δ 174.3, 73.0, 70.0,

68.6, 61.7, 55.6ppmに¹³Cのシグナルを示す。

1. 構造式



2. 分子式・分子量

C₁₁H₁₇NO₄ MW. 163.2

3. 元素分析値

C₁₁H₁₇NO₄ · ½ H₂O

計算値(%)

C. 43.68; H. 8.06; N. 8.49

実験値(%)

C. 43.68; H. 7.93; N. 8.31

4. 分解温度

218 ~ 220 °C

5. 質量分析スペクトル(第12図参照)

最高質量 m/z = 164 (M+1)

6. 比旋光度

[α]_D²⁰ +52.8° (c=1.0, 水)

7. 紫外線吸収スペクトル

特異的吸収なし

8. 赤外線吸収スペクトル(第13図参照)

ν_{max} 3360, 2900, 1640, 1450, 1400,
1360, 1290, 1235, 1150, 1055, 935, 902,
854, 810, 715, 683, 590, 505, 475, 418 cm^{-1}

9. 1H 核磁気共鳴スペクトル

第14図のごとく δ 3.33, 3.08, 2.98,
2.91, 2.80, 2.45, 2.07, 1.70 ppmに各1のプロ
トンを示す。

10. ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル

第15図のごとく δ 75.9, 70.1, 69.0, 62.2,
59.7, 49.9 ppmに ^{13}C のシグナルを示す。

11. 溶解性

水、メタノールに易溶、エタノール、プロパノ
ールに可溶、アセトン、クロロホルム、エーテ
ルに不溶

12. 呈色反応

ニンヒドリン反応 陽性
アンモニア性硝酸銀反応 凝陽性

30℃に加温しておいた上記緩衝液に溶かした基
質0.01M α -ニトロフェニル- β -D-ガラクト
ピラノース溶液0.5 mlと混和する。30℃で
15分間反応させたのち、1M炭酸ナトリウム溶
液1 mlを加えて反応を停止させ、水8 mlを添加し
て全量10 mlとした後、420 nmにおける吸光度
(A)を測定した。同時に、上記検体を含まない
緩衝液のみを用いた対照の吸光度(B)を測定
し、阻害率を $(B-A)/B \times 100$ により計算
した。なお、 β -ガラクトシダーゼはタカジア
スターゼより調製したものをを用いた。前記条件で β -
ガラクトシダーゼ活性を50%阻害(IC₅₀)
する検体を1阻害単位量(1 IU)とした。

ガラクトスタナンは公知の β -ガラクトシダー
ゼ阻害物質とは異なる性状を有しており、新規 β -
ガラクトシダーゼ阻害物質であると判断され
る。かかるガラクトスタナンの産生菌は長崎県南
松浦郡中通島にて採取された土壌試料より分離し
たPA-5726株が挙げられる。

本菌株は分類学上ストレプトマイセス・ライデ

13. シリカゲル薄層クロマトグラフィー

アセトニトリル：酢酸：水(5:1:2)

Rf=0.40

n-ブタノール：酢酸：水(3:1:2)

Rf=0.36

クロロホルム：メタノール：アンモニア(1:
2:1) Rf=0.49

14. β -ガラクトシダーゼ阻害比活性

2.170 IU/mg (IC₅₀ 0.115 mcg/ml)

15. 外観

強吸湿性の白色粉末

上記性状に示した β -ガラクトシダーゼ阻害活
性及び阻害比活性は、 α -ニトロフェニル- β -
D-ガラクトピラノースを基質として β -ガラク
トシダーゼを作用せしめ、加水分解され遊離する
 α -ニトロフェノールを比色法で定量することに
より測定した。すなわち、0.1M酢酸緩衝液
(pH5.0)に溶かした β -ガラクトシダーゼ溶
液0.25 mlに検体を含む溶液0.25 mlを加
え、30℃で10分間加温した後、あらかじめ

イッカス(*Streptomyces lydicus*)の一菌株であ
ると判断され、PA-5726株を微生物工業技術研
究所にストレプトマイセス・ライディッカスPA-
5726、微工研菌寄第5657号として寄託してある。

同菌株の菌学的諸性状は下記のとおりである。

(a) 形態学的性状(ベンネット寒天培地、28
℃、14日間培養)

胞子のう、鞭毛胞子、菌核はいずれも認められ
ず、また基底菌糸にはフラグメンテーションによ
る分裂は認められない。同培地上での気中菌糸は
豊富に形成される。胞子着生菌糸は気中菌糸上に
着生し、その主軸より単純分枝して側枝となり、
その末端はらせん状(スパイラル状)を呈する。電
子顕微鏡観察による胞子の表面構造は、平滑
(smooth type)である。本菌株は時間の経過に
ともない、コロニーの表面の一部が湿潤し、いわ
ゆるハイグロビック(hygroscopic)状になり黒
変化する。

(b) 培養上の諸性状(28℃、14日間培養)
色名の表示は「色の標準」(日本色彩研究所版)
による。

培 地	生育	気 中 菌 糸		基底菌糸の色	可溶性色素
		形成	色		
シュクロース・硝酸塩寒天培地	かなり良好	形成せず	—	うす茶色	なし
グルコース・アスパラギン寒天培地	〃	かなり良好	明るい茶色	〃	〃
グリセリン・アスパラギン寒天培地	良好	良好	〃	〃	〃
無機塩・澱粉寒天培地	〃	〃	茶灰*	〃	〃
チロシン寒天培地	〃	〃	明るい茶色	黄茶	〃
栄養寒天培地	〃	形成せず	—	〃	〃
酵母エキス・麦芽エキス寒天培地	〃	良好	茶灰*	〃	〃
オートミール寒天培地	〃	〃	〃	うす黄茶	〃
ベンネット寒天培地	〃	〃	〃*	茶色	〃

(d) 炭素源の利用能

生育に良く利用される糖

L-アラビノース、D-キシロース、D-グルコース、D-フラクトース、シュクロース、イノシトール、ラフィノースおよびD-マンニツトわずかに生育が認められた糖

L-ラムノース

以上の諸性状により本菌株はストレプトマイセス属に属する株であることは明らかである。ワックスマン著、ザ アクチノマイセテス(The Actinomycetes)第2巻(1961年)、シャーリングおよびゴットリーブのI. S. P. (International Streptomyces Project) 報告インターナショナル ジャーナル オブ システマティック バクテリオロジー(International Journal of Systematic Bacteriology)第18巻、69頁、279頁(1968年)、同第19巻391頁(1969年)、同第22巻、265頁(1972年)およびバーjeeズ マニュアル オブ デターミネイティブ バクテリオロジー(Bergey's Manual of Determinative Bac-

teriology)第8版(1974年)ならびに、その他の放線菌の新種発表文献の中からPA-5726株の近縁種を検索すると、ストレプトマイセス・ライディツカス(*Streptomyces lydicus*) [International Journal of Systematic Bacteriology 第19巻、448頁(1969年)、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版、772頁および777頁(1974年)ならびに米国特許第3160560号(1964年)]が最も近縁な種として挙げられる。

生育温度(ベンネット寒天培地、各温度で2週間培養。10℃での生育は3週間後にも判定した。)

10℃: 2週間判定、殆ど生育せず。

3週間判定、生育良好、気中菌糸の形成もかなり良好。

28℃: 生育、気中菌糸形成、胞子形成いずれも良好。

37℃: 生育せず。

45℃: 生育せず。

(c) 生理学的諸性状(28℃、14日間培養)

ゼラチンの液化能	陽性
メラノイド色素産生能	陰性
チロシナーゼ反応	陰性
ミルクのペプトン化	陽性
ミルクの凝固	陽性
澱粉の水解能	陽性

PA-5726株の諸性状とこれら文献中に記載されたストレプトマイセス・ライディツカス(*Streptomyces lydicus*)の諸性状とを比較した結果、両者の性状が極めて良く一致した。従つてPA-5726株はストレプトマイセス・ライディツカスと同種に属する一菌株であると同定し、PA-5726株はストレプトマイセス・ライディツカスPA-5726(*Streptomyces lydicus* PA-5726)と命名した。

本発明においては、上記のPA-5726株ならびにその天然および人工変異株は勿論のこと、ストレプトマイセス属ライディツカス種に属し、ガラク

トスタチンを生産する菌株はすべて使用でき、本発明の範囲内とする。

ガラクトスタチンの生産は、ガラクトスタチン産生株を栄養培地に好氣的条件下に培養し、培養終了後培養物からガラクトスタチンを分離採取することにより行なう。以下にガラクトスタチンの一般的製造方法を記載する。

培地組成、培地条件などは抗生物質の生産に一般に用いられているものを用いるとよい。培地は原則として、炭素源、窒素源、無機塩などを含む。必要に応じて、ビタミン類、先駆物質などを加えてもよい。炭素源としては、例えば、グルコース、澱粉、デキストリン、グリセリン、糖蜜、有機酸などが単独または混合物として用いられる。窒素源としては、例えば、大豆粉、コーンステープリカー、肉エキス、酵母エキス、綿実粉、ペプトン、小麦胚芽、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウムなどが単独または、混合物として用いられる。無機塩としては、例えば、炭酸カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネ

シウム、塩化コバルト、各種リン酸塩などがあげられ、必要に応じて培地に添加する。

培養は一般に抗生物質の製造に用いられる方法に準じて行なえばよく、好ましくは液体培養が、大量生産を行なう場合は、深部通気培養がよい。培地のpHが変動しうる場合には、培地に炭酸カルシウムなどの緩衝剤を加えてもよい。培養は約20～40℃で行なうとよく、特に25～32℃が好ましい。培養時間は発酵の規模に大きく左右されるが、約20～80時間が大量生産を行なう場合に要する培養時間である。培養中に激しい発泡が起こる場合には、培養前または培養中に例えば、植物油、ラード、ポリプロピレングリコールなどの消泡剤を適宜添加するとよい。

培養終了後、培養物からガラクトスタチンを分離採取するには、通常の発酵生産物を分離採取する方法を適宜用いる。例えば濾過、遠心分離、各種イオン交換樹脂やその他の活性吸着剤による吸脱着やクロマトグラフィー、各種有機溶媒による抽出などを適当に組み合わせるとよい。

ガラクトスタチンは分離操作のため、また医薬、動物薬として使用する便宜上、塩とするのが望ましいことがある。ガラクトスタチンと塩を形成しうる酸としては、亜硫酸、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、炭酸などの無機酸および酢酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、マンデル酸、アスコルビン酸、没食子酸などの有機酸がある。

さらに得られたガラクトスタチンから種々の誘導体を調製することが可能である。例えばガラクトスタチンラクトムはガラクトスタチンに次亜ヨウ素酸ナトリウム溶液、ヨウ素ヨウ化カリウム溶液、過酸化水素、オゾン、あるいは四酢酸鉛等の酸化剤を作用させることにより得られる。また、1-デオキシガラクトスタチンはガラクトスタチンを水素気流中、二酸化白金、白金パラジウム等の触媒を用いての接触還元、あるいは水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤を作用させる等して調製することができる。以上の2例だけでなく他の誘導体を調整することも可能である。これらの誘導

体も、ガラクトスタチンと塩を形成しうる前記の酸と塩を形成しうる。

実施例

以下に本発明にかかるガラクトスタチンの一群の化合物の製造例を示すが、これらの実施例は何ら本発明を制限するものではない。

実施例 1

ガラクトスタチンの調製方法

グルコース1.0%、カザミノ酸0.2%、酵母エキス0.2%、肉エキス0.1%を含む培地(pH7.0)を500ml容量の振盪フラスコに100mlずつ分注し、120℃、20分間滅菌したものを種用培地とする。

ストレプトマイセス・ライディツカスPA-5726株(Streptomyces lydicus PA-5726、微工研菌寄第5657号)の斜面培養から一金耳量を上記種用培地に接種し、28℃で毎分140往復、振巾7cmで2日間振盪培養して種母を調製する。

一方、グリセリン3.0%、肉エキス2.0%、ペプトン1.0%、塩化カリウム0.076%、塩化マグネシウム・6水和物0.042%、塩化鉄・6水和物

0.0025%、硫酸亜鉛・7水和物0.0022%、塩化マグネシウム・4水和物0.0018%を含む培地(pH 7.0)を調整する。

この培地100mlを500ml容量の振盪フラスコに分注し、120°C、30分間滅菌したものを主発酵培地として、前記の種母をこの主発酵培地に2%接種し、28°Cで毎分140往復、振巾7cmで5日間振盪培養を行なう。

この培養液中にβ-ガラクトシダーゼ阻害物質ガラクトスタチン43,500 IU/ml($IC_{50}=0.0057$ mcg/ml)が蓄積される。

実施例 2

実施例1と同様にして、主発酵培地20ℓを用いて培養を行ない、培養終了後直ちに遠心分離により菌体を分離して清澄な濾液15.8ℓを得る。

この濾液に塩酸を加えてpH4.5に調整し、活性炭1.5%(237g)を加え30分間攪拌して色素及び不純物を吸着させて、セライトを助剤として濾過し、清澄な濾液15ℓを得る。

この濾液を強塩基性陰イオン交換樹脂ダウエツ

・アンド・ハース社)1ℓを充填したカラムに注ぎ、水で展開溶出する。

溶出液のβ-ガラクトシダーゼ阻害活性区分を分画採取し、1.1ℓのガラクトスタチン溶液を得る。この溶液を再度減圧下濃縮し、150mlとする。

この濃縮液を水冷下、6%亜硫酸水(和光純薬工業)70mlを添加し、更にエタノールを500ml添加してガラクトスタチンの亜硫酸付加物を針状結晶(5.54g)として析出させる。この結晶を60°Cの熱水100mlに溶解しエタノール400mlを添加して再結晶をおこない、ガラクトスタチン亜硫酸付加物の無色針状結晶4.85gを得る。この結晶のβ-ガラクトシダーゼ阻害活性は51,900 IU/mg($IC_{50}=0.0048$ mcg/ml)である。

実施例 4

ガラクトスタチン亜硫酸付加物1gを水20mlに懸濁し、更に強塩基性陰イオン交換樹脂ダウエツクスー2×8(OH型)(商品名、ダウケミカル社)10ml添加して攪拌する。

クスー1×8(OH型)(商品名、ダウ・ケミカル社)2ℓに通過させて、陰イオン性物質を除く。この溶液を塩酸で中和し、更に強酸性陽イオン交換樹脂ダウエツクスー50W×8(H型)1ℓを充填したカラムに通液し、ガラクトスタチンを吸着させ、樹脂を十分水洗いした後、0.5N塩酸で溶出する。

溶出液のβ-ガラクトシダーゼ阻害活性区分を分画採取し、1.5ℓのガラクトスタチン溶液を得る。この溶液のβ-ガラクトシダーゼ阻害活性は238,100 IU/ml($IC_{50}=0.0010$ mcg/ml)である。

実施例 3

実施例2で得られたガラクトスタチン溶液を減圧下1/5容(300ml)に濃縮する。この濃縮液に2倍容(600ml)のエタノールを添加し析出する不純物を濾過により除去する。得られた濾液を更に減圧濃縮し、100mlとする。

この溶液を直ちに弱塩基性陰イオン交換樹脂アンバーライトIRA-47(OH型)(商品名、ローム

この溶液全量を前記と同じ樹脂ダウエツクスー2×8(OH型)200mlを充填したカラムに注ぎ水で展開溶出する。溶出液のβ-ガラクトシダーゼ阻害活性区分を分画採取し、減圧濃縮し濃縮液2mlに対してエタノール20ml添加して更に濃縮をおこない白色沈澱を生成させる。この沈澱を濾取し乾燥してガラクトスタチン遊離延期の白色粉末628mgを得る。この粉末のβ-ガラクトシダーゼ阻害活性は71,200 IU/mg($IC_{50}=0.0035$ mcg/ml)である。

実施例 5

ガラクトスタチンラクタムの調製方法

ガラクトスタチン200mgを水5mlに溶解し、攪拌しながら、4%ヨウ化カリウムを含む0.2Nヨウ素溶液2ml添加して5分間反応する。反応液に0.2N水酸化ナトリウム溶液3mlを添加して5分間攪拌した後、再びヨウ素溶液2mlを添加し上述の操作を6回くり返し、ヨウ素溶液計12ml、水酸化ナトリウム溶液計18ml添加終了後、更に50分攪拌し反応をおこなう。

この反応液全量を強酸性陽イオン交換樹脂ダウエックス-50W×8(H型)20mlを充填したカラムに注ぎ水30mlで展開溶出する。

この溶出液を攪拌しながら炭酸塩2gを添加し、30分後、生成した沈澱を濾過により除去・清澄なる濾液を得る。

この濾液を更に強酸性陽イオン交換樹脂ダウエックス-50W×8(H型)10mlを充填したカラムに注ぎ水20mlで展開溶出する。この溶出液は微酸性を呈する為、弱塩基性陰イオン交換樹脂アンバーライトIRA-47(OH型)を添加して中和する。樹脂は濾過により除去、清澄なる中性濾液を得る。

この濾液を減圧下、濃縮し、エタノールを添加してガラクトスタチンラクタムを針状結晶(105mg)として析出させる。この結晶を1mlの水に溶解し、エタノール15ml添加して再結晶をおこない、ガラクトスタチンラクタムの無色針状結晶95.1mgを得る。この結晶のβ-ガラクトシダーゼ阻害活性は43.5 IU/mg(IC₅₀=5.75mcg/ml)である。

発明の効果

ガラクトスタチンは酸性及び中性溶液中では非常に安定でありほとんど分解変化せず、GI-2558も酸性および中性溶液では比較的安定である。しかし塩基性溶液中においてGI-2558は急速に褐変分解し、シリカゲル薄層クロマトグラフィーでGI-2558と異なる原点からのテーリング物質の増加が認められるほど非常に不安定であるのに対してガラクトスタチンは、わずかにテーリングが認められる程度である。ガラクトスタチンの粉末を冷所4℃に保存する限り変色せずβ-ガラクトシダーゼ阻害活性の低下もおこらず、長期間安定であるのに対して、GI-2558はわずかであるが、黄褐色しながら変化して、β-ガラクトシダーゼ阻害活性も徐々に低下する。さらにガラクトスタチン類とGI-2558の安定性の差は、放線菌の培養濾液からの回収率の差にも現れる。以下にガラクトスタチンとGI-2558の回収率を示す。

(以下余白)

ある。

実施例 6

1-デオキシガラクトスタチンの調製方法

ガラクトスタチン200mgを50%メタノール5mlに溶解し、二酸化白金40mg及び酢酸0.2mlを添加して攪拌しながら常圧下水素気流を通じて接触還元を5時間おこなう。反応終了後、遠心分離により得られる上清を更に濾過により清澄な濾液を得る。

この濾液を減圧下濃縮した後、強塩基性陰イオン交換樹脂ダウエックス-2×8(OH型)25mlを充填したカラムに注ぎ水で展開溶出する。溶出液のβ-ガラクトシダーゼ阻害活性区分を分画採取し、減圧濃縮して油状物質を得る。

この油状物質をメタノール1mlに溶解し、アセトン2mlエーテル10ml添加して白色沈澱を生成させる。この沈澱を濾取し、乾燥して1-デオキシガラクトスタチンの白色粉末107mgを得る。この粉末のβ-ガラクトシダーゼ阻害活性は2.170 IU/mg(IC₅₀=0.115mcg/ml)である。

ガラクトスタチンとGI-2558の回収率

阻害物質	培 養 場 所	ガラクトスタチン				GI-2558			
		100 %	52.0 %	39.4 %	36.0 %	100 %	53.4 %	29.2 %	13.4 %
ガラクトスタチン	培養濾液 ダウエックス-50W×8による回収 面炭酸付加物の結晶 ガラクトスタチン					培養濾液 ダウエックス-50W×8による回収 アンバーライトIRA-47カラムクロマトグラフィー ダウエックス-50W×8カラムクロマトグラフィー GI-2558の結晶・粉末			
GI-2558									

ガラクトスタチン、その構成成分およびそれらの製薬上許容される塩はガラクトシダーゼ阻害物質としてガラクトシダーゼの活性測定試薬として用いうる。また、前記のように制癌剤として用いられる可能性も有しており、その場合これら化合物は経口的に、または非経口的にヒトまたは動物に投与される。汎用される賦形剤、安定化剤、保存剤、湿潤剤、界面活性剤などを用いて、錠剤、カプセル剤、粉剤として経口投与することができ、注射剤、塗布剤、座剤などとして非経口で投与することもでき、その投与量は治療目的、患者の年齢、症状などにより異なる。

また本発明の化合物は弱いながらも抗菌、抗ウイルス活性を有する。

4. 図面の簡単な説明

第1図はガラクトスタチンの質量分析スペクトルであり、第2図はガラクトスタチンの臭化カリウム錠中の赤外線吸収スペクトルである。第3図はガラクトスタチンの200MHz¹H核磁気共鳴スペクトルであり、0.5N重塩酸の重水中、テトラメチル

シランを標準物質として測定したものである。第4図はガラクトスタチン亜硫酸付加物の質量分析スペクトルであり、第5図はガラクトスタチン亜硫酸付加物の臭化カリウム錠中の赤外線吸収スペクトルである。第6図および第7図はガラクトスタチン亜硫酸付加物の核磁気共鳴スペクトルであり、第6図は重水中テトラメチルシランを標準物質として測定した200MHz¹H核磁気共鳴スペクトルであり、第7図は重水中アセトニトリルを標準物質として測定した25MHz¹³C核磁気共鳴スペクトルである。第8図はガラクトスタチンラクタムの質量分析スペクトルであり、第9図はガラクトスタチンラクタムの臭化カリウム錠中の赤外線吸収スペクトルである。第10図および第11図はガラクトスタチンラクタムの核磁気共鳴スペクトルであり、第10図は重水中テトラメチルシランを標準物質として測定した200MHz¹H核磁気共鳴スペクトルであり、第11図は重水中、アセトニトリルを標準物質として測定した25MHz¹³C核磁気共鳴スペクトルである。第12図は1-デオキシガラクトスタ

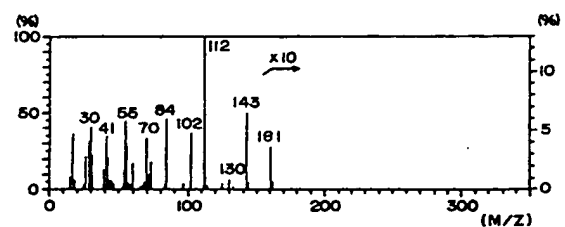
チンの質量分析スペクトルであり、第13図は1-デオキシガラクトスタチンの臭化カリウム錠中の赤外線吸収スペクトルである。第14図および第15図は1-デオキシガラクトスタチンの核磁気共鳴スペクトルであり、第14図は重水中テトラメチルシランを標準物質として測定した200MHz¹H核磁気共鳴スペクトル、第15図は重水中アセトニトリルを標準物質として測定した25MHz¹³C核磁気共鳴スペクトルである。

特許出願人 塩野義製薬株式会社

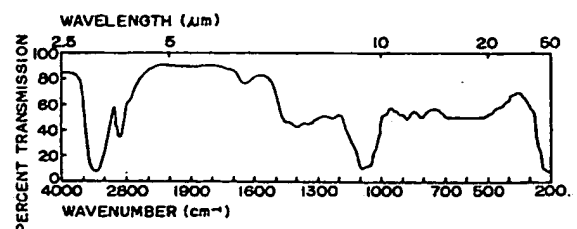
代理人 弁理士 潮田 雄

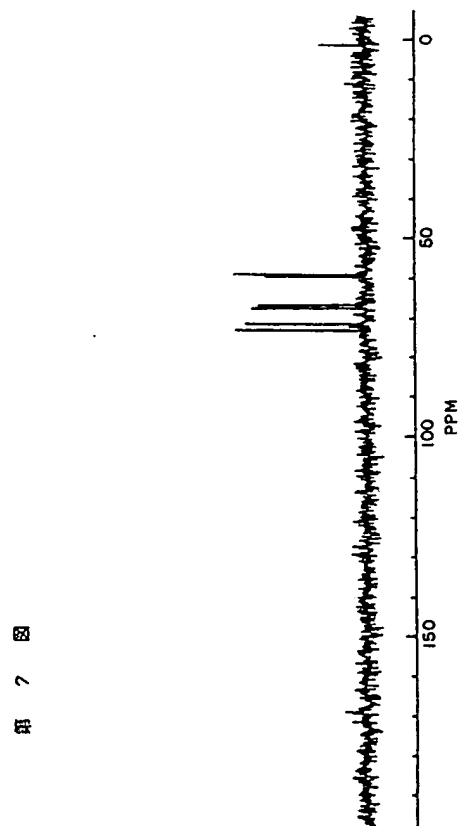
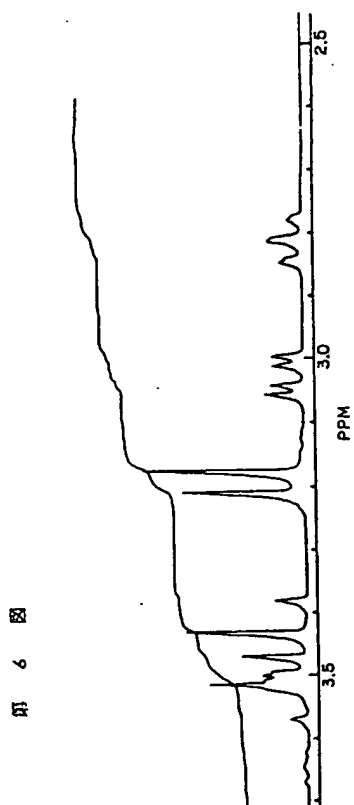
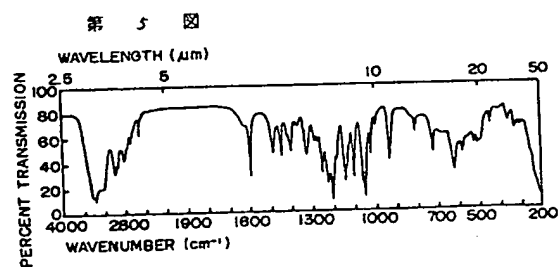
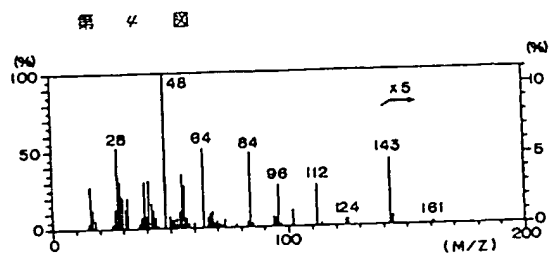
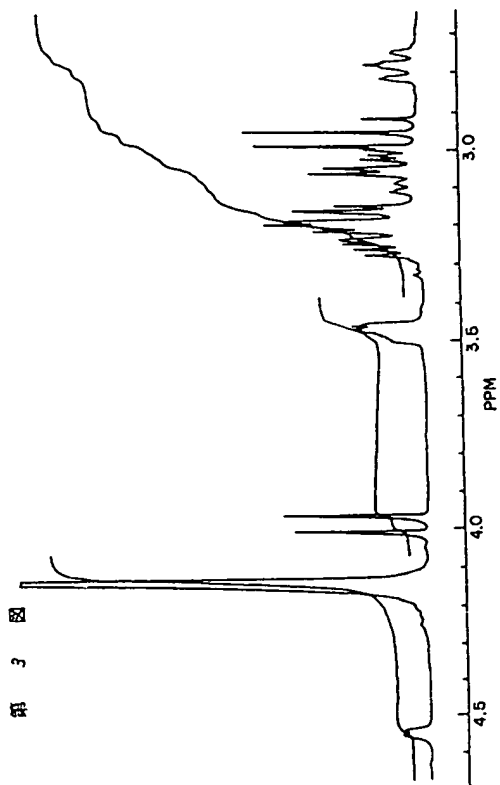


第 1 図

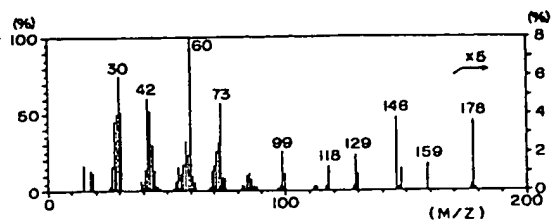


第 2 図

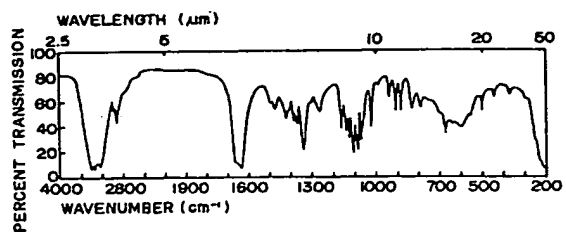




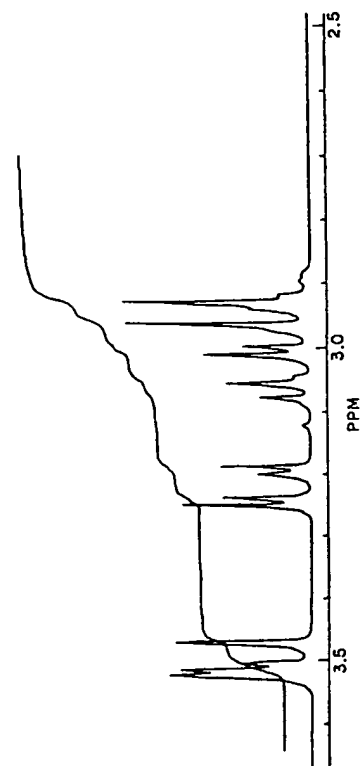
第 8 図



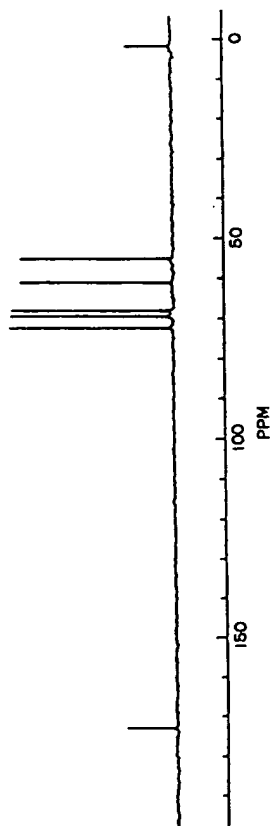
第 9 図



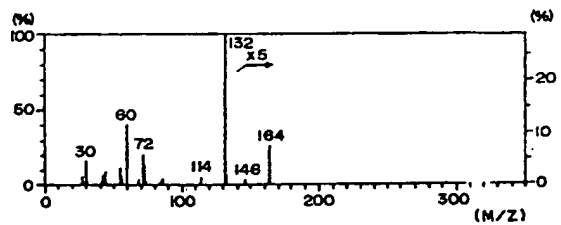
第 10 図



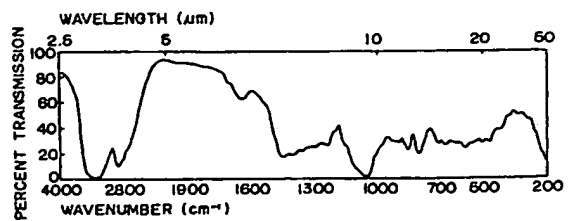
第 11 図

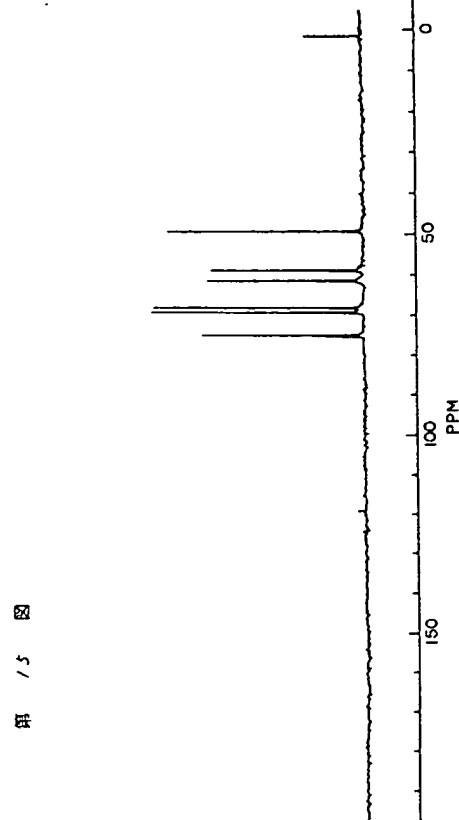
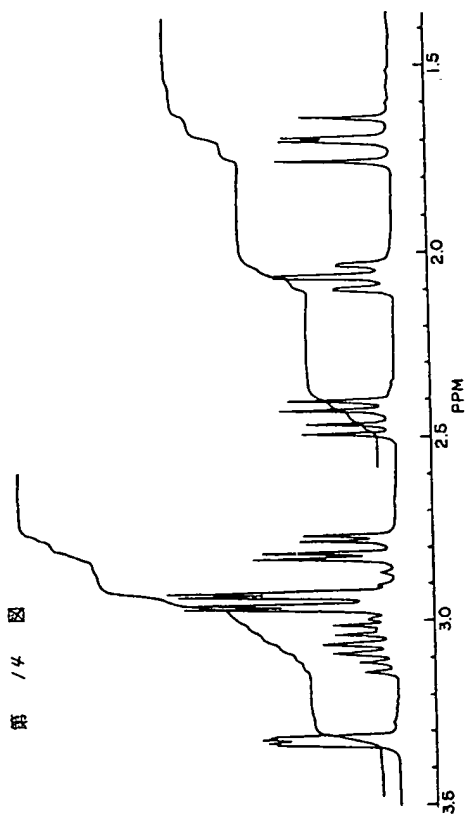


第 12 図



第 13 図





手続補正書(自発)

昭和60年 7月 3 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和60年 特 許 願 第123135号

2. 発明の名称

β-ガラクトシダーゼ阻害物質ガラクトスタチン類
およびその製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 大阪府大阪市東区道修町3丁目12番地

名称 (192) シオノギセイヤク 塩野義製薬株式会社

代表者 ヨシトシ カズオ
吉 利 一 雄

4. 代理人

住所 大阪市福島区鷺洲5丁目12番4号 〒553

塩野義製薬株式会社 特許部

(電話 06-458-5861)

氏名 弁理士(6470) 潮 田 雄

5. 補正の対象

(1) 願書

(2) 明細書の発明の詳細な説明の欄。

6. 補正の内容

(1) 願書を添付のものと差し換える。

(2) 明細書第7頁第2行、第9頁第10行、第12頁第3行および第14頁下から2行目の「比旋光度」を「比旋光度」に補正する。

(3) 同第18頁下から5行目の「ハイグロビツク」を「ハイグロスコビツク」に補正する。

(4) 同第19頁表2段目の「うす茶色」を「うす黄茶」に補正する。

(5) 同第19頁表3段目および表6段目の「明るい茶色」を「明るい茶灰」に補正する。

(6) 同第19頁表10段目の「茶色」を「黄茶」に補正する。

(7) 同第22頁第2行の「近緑」を「近緑」に補正する。

(8) 同第22頁第9行の「近種」を「近緑」に補正する。

- (9)同第25頁第9行の「ガラクトスタナン」を
「ガラクトスタナン」に補正する。
- (10)同第27頁第1～2行の「マグネシウム」
を「マンガン」に補正する。
- (11)同第27頁第20行の「強塩基生」を「強塩
基性」に補正する。
- (12)同第30頁第7行の「遊離延期」を「遊離塩
基」に補正する。
- (13)同第18頁第4行の「微工研菌寄第5657
号」を「微工研条寄第61号(微工研菌寄第56
57号)」に補正する。
- (14)同第26頁第14～15行の「微工研菌寄第
5657号」を「微工研条寄第61号(微工研菌
寄第5657号)」に補正する。

以 上

TRANSLATION

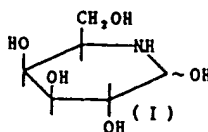
[CLAIMS]

JAPANESE PATENT APPLICATION KOKAI PUBLICATION NO. S61-280472

" β -Galactosidase Inhibitor Galactostatins and Process for the Production Thereof"

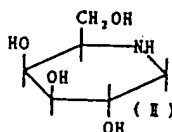
Claims

1. A galactostatin represented by Formula (I) below;

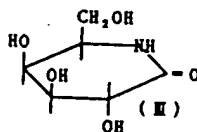


as well as derivatives and salts thereof.

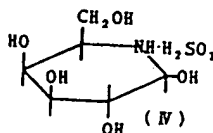
2. A derivative of Claim 1, wherein said derivative is a 1-deoxygalactostatin represented by Formula (II) below:



3. A derivative of Claim 1, wherein said derivative is a galactostatin lactam represented by Formula (III) below:



4. A salt of Claim 1, wherein said salt is a galactostatin sulfurous acid adduct represented by Formula (IV) below:



5. A process for producing galactostatins by incubating a galactostatin-producing bacterium belonging to the genus *Streptomyces*, and then separating and harvesting the galactostatin from the culture.

Translated by John F. Bukacek (773/508-0352)

TRANSLATION

[EXCERPTS]

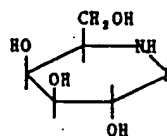
JAPANESE PATENT APPLICATION KOKAI PUBLICATION NO. S61-280472

" β -Galactosidase Inhibitor Galactostatins and Process for the Production Thereof"

3. Brief Description of the Invention

Field of Industrial Application

The present invention relates to a novel β -galactosidase inhibitor galactostatin, and in further detail, the present invention relates to a novel β -galactosidase inhibitor galactostatin represented by the following General Formula



(Where R is $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{H} \end{array}$, $\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{OH} \end{array}$, CH_2 , or C=O),

as well as salts thereof, and a process for the production thereof.

The production of galactostatins is accomplished by culturing a galactostatin-producing strain in a nutrient medium under favorable conditions, and then separating and harvesting the galactostatins from the culture after culturing. The general process for producing galactostatins is described below.

The composition of the medium and the culture conditions can be those generally employed in the production of antibiotics. In principle, the medium contains a carbon source, a nitrogen source, an inorganic salt, and the like. Vitamins, precursors, and the like can be added as needed. Examples of carbon sources include glucose, starch, dextrin, glycerol, molasses, organic acids, and the like, and these can be used alone or in combination. Examples of nitrogen sources include soy powder, corn steep liquor, meat extract, yeast extract, cottonseed powder, peptone, wheat germ, ammonium sulfate, ammonium nitrate, and the like, and these can be used alone or in combination. Examples of inorganic salts include calcium carbonate, sodium chloride, potassium chloride, magnesium sulfate, cobalt chloride, various phosphate salts, and the like, which can be added to the medium, as needed.

Culturing can be carried out in accordance with methods generally used in manufacturing antibiotics. And a submerged aeration culture is advantageous when liquid cultures are performed in mass production. In cases where the pH of the culture fluctuates, a buffering agent such as potassium carbonate can be added to the medium. Incubation can be carried out at 20-40°C, and 25-32°C is particularly advantageous. The incubation time greatly depends on the fermentation scale, but 20-80 hours are needed in the case of large-scale production. In cases where massive foaming occurs in the culture, vegetable oil, lard, polypropyleneglycol, or other defoaming agents can be added before or during culturing, as appropriate.

After culturing is completed, a suitable method of separating and harvesting ordinary fermentation products is used for separating and harvesting galactostatins. For example, filtration, centrifugation, various ion-exchange resins, and other active adsorbent-mediated adsorption-desorption and chromatography, and organic solvent-mediated extraction, and the like, can be used in combination.

For the separation operation, it is desirable to convert the galactostatins to salts for convenient use in pharmaceuticals and in animal medicines. Examples of acids that can form salts with galactostatins include inorganic acids such as sulfurous acid, hydrochloric acid, hydrobromic acid, hydroiodic acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid, and carbonic acid, as well as organic acids such as acetic acid, fumaric acid, malic acid, oxalic acid, maleic acid, citric acid, mandelic acid, ascorbic acid, gallic acid, and the like.

Moreover, a variety of derivatives can be prepared from the resulting galactostatins. For example, galactostatin lactam can be produced by causing an oxidizing agent such as a sodium hypoiodite solution, a potassium iodite iodine solution, hydrogen peroxide, ozone, or lead tetraacetate, and the like to react with the galactostatins. Furthermore, 1-galactostatin can be prepared by carrying out catalytic reduction of the galactostatin in a stream of hydrogen, using a catalyst such as platinum dioxide, platinum-palladium, and the like, or causing a reducing agent such as sodium borohydride to react with the galactostatins. Other derivatives can be prepared in addition to the two above examples. These derivatives can also form salts with the aforementioned acids that are able to form salts with galactostatins.

[*Translator's Note:* Six Working Examples follow. Please let me know if you want me to translate these examples.]

Translated by John F. Bukacek (773/508-0352)